

Prof. dr hab. Adam Prahl  
Pracownia Chemii Peptydów  
Katedra Chemii Organicznej  
Wydział Chemii UG

Gdańsk, 22.05.2017r.

### RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

#### **mgr Pauliny Fortuny pt. „Projektowanie i synteza inhibitorów oddziaływania białko-białko dla układów menina-MLL i p35-MDM2”**

Oddziaływania białko-białko odgrywają znaczącą rolę w procesach biologicznych związanych z funkcjonowaniem żywych komórek. Chodzi tu zarówno o możliwość komunikacji międzykomórkowej, jak i procesy związane bezpośrednio z rozwojem i metabolizmem komórkowym. Ludzki genom zawiera około 30 tysięcy genów odpowiedzialnych za kodowanie białek. Prowadzone badania dowiodły, że białka nie działają w warunkach *in vivo* jako osobne indywidua. Okazało się, że w ok. 80% znanych przypadków aktywność białek sprowadza się do tworzenia kompleksów z innymi białkami. W świetle tych doniesień niezwykle istotne wydaje się być badanie i wyjaśnianie mechanizmów tych oddziaływań, a co za tym idzie dokładne poznanie funkcji, jakie odgrywają one w żywych organizmach. Na chwilę obecną w odniesieniu do naszych organizmów scharakteryzowano kilkanaście tysięcy oddziaływań białko-białko. Część z nich jest bezpośrednio związana z różnymi stanami chorobowymi, w tym z rozwojem nowotworów. Wydaje się więc, że układy takie mogą stać się cennym narzędziem w walce z chorobami, w rozwój których są uwikłane. Preferowane jest takie podejście, które pozwala skutecznie i selektywnie eliminować komórki nowotworowe bez wyrządzania szkody komórkom zdrowym. Ogólnie zabiegi takie określa się mianem terapii celowanej. Leki przeciwnowotworowe nowej generacji opracowywane są tak, aby ich działanie skierowane było przeciwko nowotworom, których proces transformacji uzależniony jest od aktywności jednego białka. Sposób ich działania sprowadza się do blokowania podwyższonej aktywności białek odpowiedzialnych za wzmożoną proliferację komórek nowotworowych, zainicjowania procesu ich apoptozy lub blokowania angiogenezy w tych komórkach.

Przedstawiona do oceny praca doktorska osadzona jest w tej tematyce badawczej i bezpośrednio dotyczy dwóch układów: menina-MML i p53-MDM2. Celem badań jest poszukiwanie inhibitorów oddziaływań białko-białko w kontekście leczenia chorób nowotworowych, w wywoływaniu których one uczestniczą. Pierwszy z układów jest związany z ostrymi białaczkami spowodowanymi przegrupowaniami chromosomalnymi genu MLL z partnerami fuzyjnymi. Tak powstały gen koduje białko fuzyjne MLL, którego N-koniec zawiera N-końcowy fragment białka MLL, natomiast C-koniec pochodzi od partnera fuzyjnego (dotychczas zidentyfikowano ponad 50 takich białek). Białko fuzyjne MLL wchodzi w interakcje z różnymi innymi białkami. Jednym z nich jest menina. Oddziaływanie menina-MLL ma kluczowe znaczenie dla rozwoju ostrej białaczki, dlatego też substancje blokujące możliwość tworzenia takiego kompleksu mają potencjalne zastosowanie jako leki. Co ważne zablokowanie oddziaływania menina-MLL może hamować działanie onkogenne wszystkich fuzyjnych partnerów MLL. Drugi układ p53-MDM2 wiązany jest z szeregiem chorób nowotworowych (mięsaki, nowotwory piersi, płuc, jelita grubego - obecnie wiadomo, że mniej więcej 40 % przypadków wszelkiego rodzaju nowotworów u ludzi jest spowodowana mutacjami związanymi z działaniem bądź strukturą białka p53). Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za regulację cyklu życiowego komórek, ich apoptozy, a także procesów

naprawy materiału genetycznego. Białko ulega aktywacji w momencie wystąpienia różnego rodzaju stresów, takich jak stres cieplny, stres oksydacyjny, czy też stany patologiczne związane z niestabilnością genetyczną komórek bądź rozwojem nowotworów. Za regulację poziomu i aktywności białka p53 jest odpowiedzialna cała sieć komórkowych regulatorów, takich jak WT-1, MDM2, JNK, Pirh-2, PARP-1, MDM4. W prawidłowych warunkach białko p53 jest utrzymywane w komórce na niskim poziomie i występuje w postaci nieaktywnej - czas półtrwania białka p53 jest ograniczony do minut, podczas gdy w komórkach narażonych na stres lub ekspozycję na czynniki uszkodzające DNA, czas ten wydłuża się do godzin. Szczególnie istotne w regulacji poziomu białka p53 w komórce wydają się białka MDM2 i MDM4 (MDMX). Pełnią one rolę silnych onkogenów i stanowią znakomity cel terapeutyczny. Zablockowanie ich funkcji wiąże się bezpośrednio z przywróceniem prawidłowej aktywności białka p53.

Praca doktorska zrealizowana została w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod opieką dra hab. Łukasza Berlickiego, prof. nadzw. PW. Opracowanie obejmuje 141 stron, podzielonych na 6 rozdziałów, poprzedzonych spisem treści i wykazem stosowanych skrótów. Niewielka liczba rozdziałów zrekompensowana jest licznymi podrozdziałami. Pierwszy rozdział zatytułowany „Wstęp” obejmuje 54 strony i jest swoistym wprowadzeniem w tematykę pracy. Zawarte zostały w nim strategie projektowania i otrzymywania peptydowych inhibitorów oddziaływania białko-białko (można było zatytułować ten podrozdział strategiami projektowania peptydomimetyków) oraz charakterystyka oddziaływań menina-MLL i p53-MDM2/MDMX z podaniem dotychczasowego stanu wiedzy na temat opracowanych inhibitorów tych oddziaływań. Całość została przedstawiona bardzo syntetycznie i przystępnie. W tej części pracy zabrakło mi krótkiego wprowadzenia dotyczącego zastosowanych w badaniach technik. Kolejny rozdział to „Cel pracy” obejmujący nieco ponad stronę. W rozdziale tym dowiadujemy się o generalnej strategii zaplanowanych badań – nie ma bezpośredniego odniesienia ani do przesłanek, które wymusiły taki a nie inny plan, ani do struktury zaplanowanych do syntezy i dalszych badań analogów. Wszystkie te informacje zawarte są w kolejnym rozdziale „Wyniki i dyskusja” – 46 stron. Oprócz tego w rozdziale tym znalazły się także informacje dotyczące przeprowadzonych syntez i wykonanych badań, przedstawione i omówione zostały również uzyskane wyniki. W odniesieniu do układu p53-MDM2/MDMX Doktorantka skupiła się na modyfikacjach opublikowanego wcześniej fragmentu białka p53 odpowiedzialnego za wiązanie MDM2/MDMX (fragment obejmujący reszty aminokwasowe 17-28) oraz jego zmodyfikowanej wersji (peptydu PMI, który jest równocześnie jednym z najsilniejszych, opisanych peptydowych inhibitorów tego oddziaływania) wykazującej o około dwa rzędy wyższe powinowactwo do MDM2 i MDMX. W opisie jest mała nieścisłość, ponieważ fragment białka p53 odpowiedzialny za wiązanie MDM2/MDMX został wstępnie zdefiniowany przez Panią Paulinę jako dwunastoaminokwasowa sekwencja, natomiast modyfikowany był trzynasto-peptyd wydłużony dodatkowo o resztę asparaginy (stąd w tabeli 1 na stronie 59 fragment białka p53 17-29). Do modyfikacji obu sekwencji Doktorantka wykorzystwała izomery kwasu 2-aminocyklopentano-karboksylowego oznaczane w pracy jako CpS (1R,2S), CpR (1S,2R) i CpT (1S,2S). Pięć analogów fragmentu białka p53 wiążącego MDM2 i MDMX zaprojektowanych zostało przy pomocy symulacji komputerowych – ich sekwencje zestawione zostały w tabeli 1, natomiast w przypadku peptydu PMI Doktorantka wykonała dwa pełne skany aminokwasowe wykorzystując do tego reszty CpR i CpT oraz otrzymała 11 analogów łączących najciekawsze modyfikacje. W tym miejscu kilka uwag i pytań. Ani w tym, ani w innym miejscu pracy nie ma żadnych uzupełniających informacji dotyczących symulacji komputerowych. Zresztą zostały one wykorzystane do zaprojektowania tylko tych pięciu analogów. Opis modyfikacji zawarty nad tabelą sugeruje podstawienie między innymi reszt Asp<sup>21</sup> i Leu<sup>22</sup> – sekwencje w tabeli wskazują natomiast, że jedna z nich została po prostu usunięta. W skrócie alaniny w tabeli 1 uciekła duża litera. Do modyfikacji fragmentu białka p53 zostały użyte różne, podwójne kombinacje reszt (tutaj

użyję oznaczeń Doktorantki) CpS i CpR, natomiast w przypadku peptydu PMI pojedynczo lub wielokrotnie reszty CpR i CpT – dlaczego akurat takie kombinacje dwóch z wymienionych w pracy trzech izomerów? A co z czwartym izomerem kwasu 2-aminocyklopentanokarboksylowego – dlaczego został pominięty w badaniach? Mam tutaj również uwagę dotyczącą stosowania nazw i skrótów. W opisie badań dotyczących peptydu PMI dla reszt CpT i CpR Doktorantka używa kolejnego uproszczenia przypisując im odpowiednio symbole X i Z, ale stosuje również nazewnictwo z wykorzystaniem przedrostków cis- i trans-. Wszystko to sprawia, że śledząc opis eksperymentów i uzyskane wyniki całość staje się nieczytelna i trzeba sporo uwagi i koncentracji, aby się we wszystkim nie pogubić. W badaniu drugiego z układów (menina-MLL) Doktorantka również wykorzystwała wyniki wcześniejszych prac, które doprowadziły do wytypowania fragmentu, czy też fragmentów w obrębie białka MLL odpowiedzialnych za interakcje z meniną. Jeden z nich oznaczany jako MLL12 i obejmujący fragment N-końcowy 4-15 białka MLL stał się prekursorem zaplanowanych do syntezy i otrzymanych analogów. Zaproponowane modyfikacje struktury sprowadzały się do umieszczenia w pozycji zajmowanej przez resztę Pro<sup>10</sup>, kluczową dla wiązania się białka MLL z meniną, każdej z trzech, wymienionych wcześniej reszt, izomerycznych kwasów 2-aminocyklopentanokarboksylowych z drobną korektą dotyczącą długości peptydów. Kolejna seria analogów powstała poprzez cyklizację fragmentu odpowiedzialnego za wiązanie meniny, naśladującego strukturę modelowego peptydu otrzymaną poprzez utworzenie wiązania wodorowego pomiędzy łańcuchem bocznym reszty argininy w pozycji 8 a grupą karbonylową proliny w pozycji 13. Efekt został osiągnięty poprzez zastąpienie reszt Arg<sup>8</sup> i Arg<sup>12</sup> resztami alliloglicyny, a następnie cyklizację układu. Otrzymano w ten sposób serię peptydów zawierających mostki węglowodorowe o różnej długości i różnym stopniu nasycenia. W tym miejscu dodatkowym zadaniem okazało się samo zamknięcie pierścienia i w wybranych przypadkach redukcja mostka. Doktorantka świetnie poradziła sobie z tym problemem poprzez dobór odpowiedniego katalizatora i warunków reakcji. Zsyntezowane zostały również liniowe analogi peptydów cyklicznych. Jeden z otrzymanych w tej serii peptydów oznaczony jako peptyd 93 stał się prekursorem ostatniej już serii analogów, które zaprojektowano z myślą o zbadaniu wpływu podstawników wokół cyklicznego szkieletu oraz znaczenia charakteru węglowodorowego łącznika (nasycony, bądź nienasycony) na ich aktywność inhibitorową. Modyfikacjom podlegał w tym wypadku C- i N-końiec peptydu oraz reszty Phe<sup>9</sup> i Ala<sup>11</sup>. Peptydy otrzymano z wykorzystaniem techniki SPPS przy użyciu aparatów, które zostały wymienione w pracy. W trakcie badań Doktorantka otrzymała w sumie 88 sekwencji podzielonych zgodnie z planem na kilka grup. W tym miejscu uwaga dotycząca numeracji otrzymanych związków. Pani Paulina przyjęła konwencję numerowania każdego związku, który pojawia się w pracy. Stąd też pierwszy, zsyntezowany w trakcie realizacji badań peptyd otrzymał numer 29.

Wszystkie otrzymane peptydowe inhibitory dla obu oddziaływań zostały przebadane pod kątem aktywności inhibitorowej z wykorzystaniem testu polaryzacji fluorescencji. Dla wszystkich peptydów otrzymanych z myślą o poszukiwaniu aktywnych inhibitorów oddziaływania p53-MDM2/MDMX wykonana została analiza konformacyjna z wykorzystaniem techniki CD w dwóch układach: wodzie i metanolu. Celem badań było potwierdzenie preferencji konformacyjnych otrzymanych związków. Wybrane peptydy z tej dużej grupy związków przebadane zostały również pod kątem stabilności proteolitycznej wobec chymotrypsyny. Do najważniejszych osiągnięć doktorantki zaliczyłbym:

- otrzymanie szeregu aktywnych inhibitorów zarówno oddziaływania p53-MDM2/MDMX, jak i MLL/menina – w obu przypadkach aktywność otrzymanych peptydów znacząco przekraczała aktywność peptydów modelowych;

- otrzymanie inhibitorów oddziaływania p53-MDM2/MDMX odpornych na proteolizę – w grupie tej znalazły się również te o najwyższej aktywności;

- opracowanie, czy też dopracowanie metody otrzymywania cyklicznych peptydów z wykorzystaniem reakcji metatezy i następnie ich redukcji – jest to szczególnie istotne w świetle danych literaturowych, zapewniających, że przemiany takie są zbadane i proste do zrealizowania. Doktorantka zderzyła się z nieco inną rzeczywistością, ale doskonale rozwiązała napotkany problem;

- otrzymanie struktur krystalicznych dla kompleksów otrzymanych inhibitorów dla obu oddziaływań białko-białko odpowiednio z MDM2 (1 struktura) i meniną (3 struktury, choć tylko jedna z zadowalającą dokładnością). Szkoda tylko, że nie były to kompleksy najaktywniejszych z otrzymanych inhibitorów dla obu grup oddziaływań.

„Podsumowanie” to prawie trzystronicowy, kolejny – czwarty rozdział w pracy. W rozdziale tym Doktorantka zebrała w sposób bardzo syntetyczny efekty przeprowadzonych syntez i oznaczeń z podziałem ich na dwa typy oddziaływań, które były przedmiotem przeprowadzonych badań. Piąty rozdział to „Część eksperymentalna”, licząca 20 stron. Oprócz zebranych danych dotyczących charakterystyki otrzymanych peptydów (tabela 14) znalazły się w nim informacje dotyczące wykorzystanych odczynników, aparatury naukowo-badawczej, krótkie informacje na temat stosowanych technik i dokładne opisy przeprowadzonych syntez. Całość rozprawy opatrzona jest 175 pozycjami literaturowymi obejmującymi nieco ponad 20 ostatnich lat (1994-2017), 55 rysunkami i 14 tabelami. Wykaz literatury stanowi ostatni rozdział pracy zatytułowany „Literatura” – 13 stron. Wszystkie zacytowane artykuły zostały wymienione z ich tytułami co znacząco ułatwiło odwoływanie się do nich. Oprawa graficzna całego opracowania jest na bardzo wysokim poziomie. Jedyne uwagi dotyczą rysunku 27 (B) na stronie 60 (bardzo trudno rozróżnić dwie struktury zakotwiczonych peptydów) i rysunku 42 (A) na stronie 82 (zaznaczone dwa wiązania wodorowe są bardzo mało czytelne). Mam też zastrzeżenia co do opisu wiązań wodorowych na rysunku 82 (opis zawarty zarówno pod rysunkiem jak i w treści pracy) – „Wiązania wodorowe pomiędzy C-końcową grupą amidową a Lys51 oraz pomiędzy grupą karbonylową a amidową reszty CpR...”. Jest on bardzo żargonowy i nieprecyzyjny. Można było pokusić się o precyzyjniejszy i bardziej poprawny chemicznie opis obu oddziaływań.

W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na jeszcze kilka rzeczy. Po pierwsze praca niefortunnie napisana jest w trybie bezosobowym. Moim zdaniem dużo jaśniej i przejrzysiej byłoby wszystkie czynności, które wykonała Doktorantka opisać w formie osobowej. W zawartej w piątym rozdziale pracy tabeli 14, w której zestawione zostały dane charakteryzujące otrzymane peptydy znalazły się między innymi czasy retencji dla etapów preparatywnego oczyszczania peptydów, które moim zdaniem niczego nie wnoszą. Jeżeli dobrze zrozumiałem warunki analiz z wykorzystaniem analitycznego HPLC właściwy rozdział dotyczył gradientu od 10 do 90 % acetonitrylu w 9 minut – to chyba trochę zbyt odważnie. W pracy znalazło się sporo niefortunnych sformułowań dotyczących głównie stosowania żargonu chemicznego i przejęczyzeń. Wymienię ich tylko kilka:

- str. 11 - „..., a wyniki powinowactwa są często bardzo słabe [8].”;

- str. 13 - „...znanymi metodami są zmiana stereochemii (użycie D-aminokwasów),...”;

- str. 15 - „...łącznik zamykający cykl...”;

- str. 38 - jest „miąsak” zamiast „mięsak”, przy typie choroby nowotworowej;

- str. 36 - „Niemniej jednak, w oparciu o badania genetyczne, myszy wykazują niejednorodną odpowiedź na przywrócenie p53.”;

- str. 38 - „Jednym z najsilniejszych związków...”;
- str. 47 - „...motyw MLL wiążący meninę), obejmujący obszar od 6 do 25 reszt aminokwasowych...”;
- w kilku miejscach pracy zamiennie używane są sformułowania (z odpowiednimi przedrostkami odnoszącymi się o wielkości liczbowej) definiujące aktywność analogów: „molarna” oraz „molowa”;
- str.115 - akapit podsumowujący opis syntezy Fmoc-CpS kończy zdanie – „Dla każdego enancjomeru przeprowadzono syntezę kwasu...” – chodzi o odwołanie do otrzymywania pochodnych Fmoc- dwóch pozostałych izomerów – w tym przypadku enancjomerem jest tylko jeden z nich.

Wszystkie te uwagi nie obniżają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej Pani mgr Pauliny Fortuny. W swoich badaniach wykazała się Ona sporą wiedzą i umiejętnościami czego efektem jest szereg znaczących odkryć. Potrafiła znakomicie połączyć metody teoretyczne z syntezą, wyciągając prawidłowe wnioski z przeprowadzonych eksperymentów. Były one z kolei siłą napędową kolejnych planowanych prac. W załączonej do pracy doktorskiej dokumentacji zabrakło wykazu dorobku naukowego Doktorantki. Z informacji zawartych w bazie *Web of Science* wynika, że jest Ona na pewno współautorką dwóch publikacji z listy JCR i jednej prezentacji na konferencji międzynarodowej. Pewnie zgodnie z obowiązującymi zwyczajami dorobek ten będzie w pełni zaprezentowany w trakcie publicznej obrony. W tym miejscu i na tą chwilę pokuszę się tylko o komentarz, że wszystkie trzy prace zawarte w bazie związane są bezpośrednio z tematyką pracy doktorskiej.

Wobec powyższego uważam, że praca doktorska mgr Pauliny Fortuny spełnia wszelkie wymagania ustawowe określone w art. 17 Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 wraz z późniejszymi poprawkami w art. 251 ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym z dnia 15 stycznia 2004 oraz w zaleceniach Centralnej Komisji ds. Tytułu Naukowego i Stopni Naukowych z dnia 20 maja 2002 i z dnia 14 października 2005 i tym samym, po spełnieniu pozostałych wymogów, stanowi podstawę nadania jej stopnia naukowego doktora. Zwracam się zatem do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej z wnioskiem o dopuszczenie mgr Pauliny Fortuny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Adam Prahl*

Prof. dr hab. Adam Prahl  
Pracownia Chemii Peptydów  
Katedra Chemii Organicznej  
Wydział Chemii UG

Gdańsk, 22.05.2017r.

### RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

#### **mgr Pauliny Fortuny pt. „Projektowanie i synteza inhibitorów oddziaływania białko-białko dla układów menina-MLL i p35-MDM2”**

Oddziaływania białko-białko odgrywają znaczącą rolę w procesach biologicznych związanych z funkcjonowaniem żywych komórek. Chodzi tu zarówno o możliwość komunikacji międzykomórkowej, jak i procesy związane bezpośrednio z rozwojem i metabolizmem komórkowym. Ludzki genom zawiera około 30 tysięcy genów odpowiedzialnych za kodowanie białek. Prowadzone badania dowiodły, że białka nie działają w warunkach *in vivo* jako osobne indywidua. Okazało się, że w ok. 80% znanych przypadków aktywność białek sprowadza się do tworzenia kompleksów z innymi białkami. W świetle tych doniesień niezwykle istotne wydaje się być badanie i wyjaśnianie mechanizmów tych oddziaływań, a co za tym idzie dokładne poznanie funkcji, jakie odgrywają one w żywych organizmach. Na chwilę obecną w odniesieniu do naszych organizmów scharakteryzowano kilkanaście tysięcy oddziaływań białko-białko. Część z nich jest bezpośrednio związana z różnymi stanami chorobowymi, w tym z rozwojem nowotworów. Wydaje się więc, że układy takie mogą stać się cennym narzędziem w walce z chorobami, w rozwój których są uwikłane. Preferowane jest takie podejście, które pozwala skutecznie i selektywnie eliminować komórki nowotworowe bez wyrządzania szkody komórkom zdrowym. Ogólnie zabiegi takie określa się mianem terapii celowanej. Leki przeciwnowotworowe nowej generacji opracowywane są tak, aby ich działanie skierowane było przeciwko nowotworom, których proces transformacji uzależniony jest od aktywności jednego białka. Sposób ich działania sprowadza się do blokowania podwyższonej aktywności białek odpowiedzialnych za wzmożoną proliferację komórek nowotworowych, zainicjowania procesu ich apoptozy lub blokowania angiogenezy w tych komórkach.

Przedstawiona do oceny praca doktorska osadzona jest w tej tematyce badawczej i bezpośrednio dotyczy dwóch układów: menina-MML i p53-MDM2. Celem badań jest poszukiwanie inhibitorów oddziaływań białko-białko w kontekście leczenia chorób nowotworowych, w wywoływaniu których one uczestniczą. Pierwszy z układów jest związany z ostrymi białaczkami spowodowanymi przegrupowaniami chromosomalnymi genu MLL z partnerami fuzyjnymi. Tak powstały gen koduje białko fuzyjne MLL, którego N-koniec zawiera N-końcowy fragment białka MLL, natomiast C-koniec pochodzi od partnera fuzyjnego (dotychczas zidentyfikowano ponad 50 takich białek). Białko fuzyjne MLL wchodzi w interakcje z różnymi innymi białkami. Jednym z nich jest menina. Oddziaływanie menina-MLL ma kluczowe znaczenie dla rozwoju ostrej białaczki, dlatego też substancje blokujące możliwość tworzenia takiego kompleksu mają potencjalne zastosowanie jako leki. Co ważne zablokowanie oddziaływania menina-MLL może hamować działanie onkogenne wszystkich fuzyjnych partnerów MLL. Drugi układ p53-MDM2 wiązany jest z szeregiem chorób nowotworowych (mięsaki, nowotwory piersi, płuc, jelita grubego - obecnie wiadomo, że mniej więcej 40 % przypadków wszelkiego rodzaju nowotworów u ludzi jest spowodowana mutacjami związanymi z działaniem bądź strukturą białka p53). Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za regulację cyklu życiowego komórek, ich apoptozy, a także procesów

naprawy materiału genetycznego. Białko ulega aktywacji w momencie wystąpienia różnego rodzaju stresów, takich jak stres cieplny, stres oksydacyjny, czy też stany patologiczne związane z niestabilnością genetyczną komórek bądź rozwojem nowotworów. Za regulację poziomu i aktywności białka p53 jest odpowiedzialna cała sieć komórkowych regulatorów, takich jak WT-1, MDM2, JNK, Pirh-2, PARP-1, MDM4. W prawidłowych warunkach białko p53 jest utrzymywane w komórce na niskim poziomie i występuje w postaci nieaktywnej - czas półtrwania białka p53 jest ograniczony do minut, podczas gdy w komórkach narażonych na stres lub ekspozycję na czynniki uszkodzające DNA, czas ten wydłuża się do godzin. Szczególnie istotne w regulacji poziomu białka p53 w komórce wydają się białka MDM2 i MDM4 (MDMX). Pełnią one rolę silnych onkogenów i stanowią znakomity cel terapeutyczny. Zablockowanie ich funkcji wiąże się bezpośrednio z przywróceniem prawidłowej aktywności białka p53.

Praca doktorska zrealizowana została w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod opieką dra hab. Łukasza Berlickiego, prof. nadzw. PW. Opracowanie obejmuje 141 stron, podzielonych na 6 rozdziałów, poprzedzonych spisem treści i wykazem stosowanych skrótów. Niewielka liczba rozdziałów zrekompensowana jest licznymi podrozdziałami. Pierwszy rozdział zatytułowany „Wstęp” obejmuje 54 strony i jest swoistym wprowadzeniem w tematykę pracy. Zawarte zostały w nim strategie projektowania i otrzymywania peptydowych inhibitorów oddziaływania białko-białko (można było zatytułować ten podrozdział strategiami projektowania peptydomimetyków) oraz charakterystyka oddziaływań menina-MLL i p53-MDM2/MDMX z podaniem dotychczasowego stanu wiedzy na temat opracowanych inhibitorów tych oddziaływań. Całość została przedstawiona bardzo syntetycznie i przystępnie. W tej części pracy zabrakło mi krótkiego wprowadzenia dotyczącego zastosowanych w badaniach technik. Kolejny rozdział to „Cel pracy” obejmujący nieco ponad stronę. W rozdziale tym dowiadujemy się o generalnej strategii zaplanowanych badań – nie ma bezpośredniego odniesienia ani do przesłanek, które wymusiły taki a nie inny plan, ani do struktury zaplanowanych do syntezy i dalszych badań analogów. Wszystkie te informacje zawarte są w kolejnym rozdziale „Wyniki i dyskusja” – 46 stron. Oprócz tego w rozdziale tym znalazły się także informacje dotyczące przeprowadzonych syntez i wykonanych badań, przedstawione i omówione zostały również uzyskane wyniki. W odniesieniu do układu p53-MDM2/MDMX Doktorantka skupiła się na modyfikacjach opublikowanego wcześniej fragmentu białka p53 odpowiedzialnego za wiązanie MDM2/MDMX (fragment obejmujący reszty aminokwasowe 17-28) oraz jego zmodyfikowanej wersji (peptydu PMI, który jest równocześnie jednym z najsilniejszych, opisanych peptydowych inhibitorów tego oddziaływania) wykazującej o około dwa rzędy wyższe powinowactwo do MDM2 i MDMX. W opisie jest mała nieścisłość, ponieważ fragment białka p53 odpowiedzialny za wiązanie MDM2/MDMX został wstępnie zdefiniowany przez Panią Paulinę jako dwunastoaminokwasowa sekwencja, natomiast modyfikowany był trzynasto-peptyd wydłużony dodatkowo o resztę asparaginy (stąd w tabeli 1 na stronie 59 fragment białka p53 17-29). Do modyfikacji obu sekwencji Doktorantka wykorzystwała izomery kwasu 2-aminocyklopentano-karboksylowego oznaczane w pracy jako CpS (1R,2S), CpR (1S,2R) i CpT (1S,2S). Pięć analogów fragmentu białka p53 wiążącego MDM2 i MDMX zaprojektowanych zostało przy pomocy symulacji komputerowych – ich sekwencje zestawione zostały w tabeli 1, natomiast w przypadku peptydu PMI Doktorantka wykonała dwa pełne skany aminokwasowe wykorzystując do tego reszty CpR i CpT oraz otrzymała 11 analogów łączących najciekawsze modyfikacje. W tym miejscu kilka uwag i pytań. Ani w tym, ani w innym miejscu pracy nie ma żadnych uzupełniających informacji dotyczących symulacji komputerowych. Zresztą zostały one wykorzystane do zaprojektowania tylko tych pięciu analogów. Opis modyfikacji zawarty nad tabelą sugeruje podstawienie między innymi reszt Asp<sup>21</sup> i Leu<sup>22</sup> – sekwencje w tabeli wskazują natomiast, że jedna z nich została po prostu usunięta. W skrócie alaniny w tabeli 1 uciekła duża litera. Do modyfikacji fragmentu białka p53 zostały użyte różne, podwójne kombinacje reszt (tutaj

użyję oznaczeń Doktorantki) CpS i CpR, natomiast w przypadku peptydu PMI pojedynczo lub wielokrotnie reszty CpR i CpT – dlaczego akurat takie kombinacje dwóch z wymienionych w pracy trzech izomerów? A co z czwartym izomerem kwasu 2-aminocyklopentanokarboksylowego – dlaczego został pominięty w badaniach? Mam tutaj również uwagę dotyczącą stosowania nazw i skrótów. W opisie badań dotyczących peptydu PMI dla reszt CpT i CpR Doktorantka używa kolejnego uproszczenia przypisując im odpowiednio symbole X i Z, ale stosuje również nazewnictwo z wykorzystaniem przedrostków cis- i trans-. Wszystko to sprawia, że śledząc opis eksperymentów i uzyskane wyniki całość staje się nieczytelna i trzeba sporo uwagi i koncentracji, aby się we wszystkim nie pogubić. W badaniu drugiego z układów (menina-MLL) Doktorantka również wykorzystwała wyniki wcześniejszych prac, które doprowadziły do wytypowania fragmentu, czy też fragmentów w obrębie białka MLL odpowiedzialnych za interakcje z meniną. Jeden z nich oznaczany jako MLL12 i obejmujący fragment N-końcowy 4-15 białka MLL stał się prekursorem zaplanowanych do syntezy i otrzymanych analogów. Zaproponowane modyfikacje struktury sprowadzały się do umieszczenia w pozycji zajmowanej przez resztę Pro<sup>10</sup>, kluczową dla wiązania się białka MLL z meniną, każdej z trzech, wymienionych wcześniej reszt, izomerycznych kwasów 2-aminocyklopentanokarboksylowych z drobną korektą dotyczącą długości peptydów. Kolejna seria analogów powstała poprzez cyklizację fragmentu odpowiedzialnego za wiązanie meniny, naśladującego strukturę modelowego peptydu otrzymaną poprzez utworzenie wiązania wodorowego pomiędzy łańcuchem bocznym reszty argininy w pozycji 8 a grupą karbonylową proliny w pozycji 13. Efekt został osiągnięty poprzez zastąpienie reszt Arg<sup>8</sup> i Arg<sup>12</sup> resztami alliloglicyny, a następnie cyklizację układu. Otrzymano w ten sposób serię peptydów zawierających mostki węglowodorowe o różnej długości i różnym stopniu nasycenia. W tym miejscu dodatkowym zadaniem okazało się samo zamknięcie pierścienia i w wybranych przypadkach redukcja mostka. Doktorantka świetnie poradziła sobie z tym problemem poprzez dobór odpowiedniego katalizatora i warunków reakcji. Zsyntezowane zostały również liniowe analogi peptydów cyklicznych. Jeden z otrzymanych w tej serii peptydów oznaczony jako peptyd 93 stał się prekursorem ostatniej już serii analogów, które zaprojektowano z myślą o zbadaniu wpływu podstawników wokół cyklicznego szkieletu oraz znaczenia charakteru węglowodorowego łącznika (nasycony, bądź nienasycony) na ich aktywność inhibitorową. Modyfikacjom podlegał w tym wypadku C- i N-końiec peptydu oraz reszty Phe<sup>9</sup> i Ala<sup>11</sup>. Peptydy otrzymano z wykorzystaniem techniki SPPS przy użyciu aparatów, które zostały wymienione w pracy. W trakcie badań Doktorantka otrzymała w sumie 88 sekwencji podzielonych zgodnie z planem na kilka grup. W tym miejscu uwaga dotycząca numeracji otrzymanych związków. Pani Paulina przyjęła konwencję numerowania każdego związku, który pojawia się w pracy. Stąd też pierwszy, zsyntezowany w trakcie realizacji badań peptyd otrzymał numer 29.

Wszystkie otrzymane peptydowe inhibitory dla obu oddziaływań zostały przebadane pod kątem aktywności inhibitorowej z wykorzystaniem testu polaryzacji fluorescencji. Dla wszystkich peptydów otrzymanych z myślą o poszukiwaniu aktywnych inhibitorów oddziaływania p53-MDM2/MDMX wykonana została analiza konformacyjna z wykorzystaniem techniki CD w dwóch układach: wodzie i metanolu. Celem badań było potwierdzenie preferencji konformacyjnych otrzymanych związków. Wybrane peptydy z tej dużej grupy związków przebadane zostały również pod kątem stabilności proteolitycznej wobec chymotrypsyny. Do najważniejszych osiągnięć doktorantki zaliczyłbym:

- otrzymanie szeregu aktywnych inhibitorów zarówno oddziaływania p53-MDM2/MDMX, jak i MLL/menina – w obu przypadkach aktywność otrzymanych peptydów znacząco przekraczała aktywność peptydów modelowych;



- otrzymanie inhibitorów oddziaływania p53-MDM2/MDMX odpornych na proteolizę – w grupie tej znalazły się również te o najwyższej aktywności;

- opracowanie, czy też dopracowanie metody otrzymywania cyklicznych peptydów z wykorzystaniem reakcji metatezy i następnie ich redukcji – jest to szczególnie istotne w świetle danych literaturowych, zapewniających, że przemiany takie są zbadane i proste do zrealizowania. Doktorantka zderzyła się z nieco inną rzeczywistością, ale doskonale rozwiązała napotkany problem;

- otrzymanie struktur krystalicznych dla kompleksów otrzymanych inhibitorów dla obu oddziaływań białko-białko odpowiednio z MDM2 (1 struktura) i meniną (3 struktury, choć tylko jedna z zadowalającą dokładnością). Szkoda tylko, że nie były to kompleksy najaktywniejszych z otrzymanych inhibitorów dla obu grup oddziaływań.

„Podsumowanie” to prawie trzystronicowy, kolejny – czwarty rozdział w pracy. W rozdziale tym Doktorantka zebrała w sposób bardzo syntetyczny efekty przeprowadzonych syntez i oznaczeń z podziałem ich na dwa typy oddziaływań, które były przedmiotem przeprowadzonych badań. Piąty rozdział to „Część eksperymentalna”, licząca 20 stron. Oprócz zebranych danych dotyczących charakterystyki otrzymanych peptydów (tabela 14) znalazły się w nim informacje dotyczące wykorzystanych odczynników, aparatury naukowo-badawczej, krótkie informacje na temat stosowanych technik i dokładne opisy przeprowadzonych syntez. Całość rozprawy opatrzona jest 175 pozycjami literaturowymi obejmującymi nieco ponad 20 ostatnich lat (1994-2017), 55 rysunkami i 14 tabelami. Wykaz literatury stanowi ostatni rozdział pracy zatytułowany „Literatura” – 13 stron. Wszystkie zacytowane artykuły zostały wymienione z ich tytułami co znacząco ułatwiło odwoływanie się do nich. Oprawa graficzna całego opracowania jest na bardzo wysokim poziomie. Jedyne uwagi dotyczą rysunku 27 (B) na stronie 60 (bardzo trudno rozróżnić dwie struktury zakotwiczonych peptydów) i rysunku 42 (A) na stronie 82 (zaznaczone dwa wiązania wodorowe są bardzo mało czytelne). Mam też zastrzeżenia co do opisu wiązań wodorowych na rysunku 82 (opis zawarty zarówno pod rysunkiem jak i w treści pracy) – „Wiązania wodorowe pomiędzy C-końcową grupą amidową a Lys51 oraz pomiędzy grupą karbonylową a amidową reszty CpR...”. Jest on bardzo żargonowy i nieprecyzyjny. Można było pokusić się o precyzyjniejszy i bardziej poprawny chemicznie opis obu oddziaływań.

W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na jeszcze kilka rzeczy. Po pierwsze praca niefortunnie napisana jest w trybie bezosobowym. Moim zdaniem dużo jaśniej i przejrzysiej byłoby wszystkie czynności, które wykonała Doktorantka opisać w formie osobowej. W zawartej w piątym rozdziale pracy tabeli 14, w której zestawione zostały dane charakteryzujące otrzymane peptydy znalazły się między innymi czasy retencji dla etapów preparatywnego oczyszczania peptydów, które moim zdaniem niczego nie wnoszą. Jeżeli dobrze zrozumiałem warunki analiz z wykorzystaniem analitycznego HPLC właściwy rozdział dotyczył gradientu od 10 do 90 % acetonitrylu w 9 minut – to chyba trochę zbyt odważnie. W pracy znalazło się sporo niefortunnych sformułowań dotyczących głównie stosowania żargonu chemicznego i przejęczyzeń. Wymienię ich tylko kilka:

- str. 11 - „..., a wyniki powinowactwa są często bardzo słabe [8].”;

- str. 13 - „...znanymi metodami są zmiana stereochemii (użycie D-aminokwasów),...”;

- str. 15 - „...łącznik zamykający cykl...”;

- str. 38 - jest „miąsak” zamiast „mięsak”, przy typie choroby nowotworowej;

- str. 36 - „Niemniej jednak, w oparciu o badania genetyczne, myszy wykazują niejednorodną odpowiedź na przywrócenie p53.”;

- str. 38 - „Jednym z najsilniejszych związków...”;
- str. 47 - „...motyw MLL wiążący meninę), obejmujący obszar od 6 do 25 reszt aminokwasowych...”;
- w kilku miejscach pracy zamiennie używane są sformułowania (z odpowiednimi przedrostkami odnoszącymi się o wielkości liczbowej) definiujące aktywność analogów: „molarna” oraz „molowa”;
- str.115 - akapit podsumowujący opis syntezy Fmoc-CpS kończy zdanie – „Dla każdego enancjomeru przeprowadzono syntezę kwasu...” – chodzi o odwołanie do otrzymywania pochodnych Fmoc- dwóch pozostałych izomerów – w tym przypadku enancjomerem jest tylko jeden z nich.

Wszystkie te uwagi nie obniżają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej Pani mgr Pauliny Fortuny. W swoich badaniach wykazała się Ona sporą wiedzą i umiejętnościami czego efektem jest szereg znaczących odkryć. Potrafiła znakomicie połączyć metody teoretyczne z syntezą, wyciągając prawidłowe wnioski z przeprowadzonych eksperymentów. Były one z kolei siłą napędową kolejnych planowanych prac. W załączonej do pracy doktorskiej dokumentacji zabrakło wykazu dorobku naukowego Doktorantki. Z informacji zawartych w bazie *Web of Science* wynika, że jest Ona na pewno współautorką dwóch publikacji z listy JCR i jednej prezentacji na konferencji międzynarodowej. Pewnie zgodnie z obowiązującymi zwyczajami dorobek ten będzie w pełni zaprezentowany w trakcie publicznej obrony. W tym miejscu i na tą chwilę pokuszę się tylko o komentarz, że wszystkie trzy prace zawarte w bazie związane są bezpośrednio z tematyką pracy doktorskiej.

Wobec powyższego uważam, że praca doktorska mgr Pauliny Fortuny spełnia wszelkie wymagania ustawowe określone w art. 17 Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14 marca 2003 wraz z późniejszymi poprawkami w art. 251 ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym z dnia 15 stycznia 2004 oraz w zaleceniach Centralnej Komisji ds. Tytułu Naukowego i Stopni Naukowych z dnia 20 maja 2002 i z dnia 14 października 2005 i tym samym, po spełnieniu pozostałych wymogów, stanowi podstawę nadania jej stopnia naukowego doktora. Zwracam się zatem do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej z wnioskiem o dopuszczenie mgr Pauliny Fortuny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Adam Prahl*